

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОМЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАПНА-АМИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОК КРОВИ, ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, МИКРООРГАНИЗМОВ И СЛЮНЫ

***Сенькович С.А., Окулич В.К., Кундер Е.В., Жаркова О.А.,
Семенова Н.В.***

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Нарушение равновесия между активностью трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов приводит к изменению резистентности организма, являясь важным звеном патогенеза различных заболеваний. БАПНА-амидазная активность является одним из видов трипсиноподобной активности [1, 5].

В 80-е годы 20-го столетия у лиц, больных системными заболеваниями соединительной ткани, щитовидной железы, геликобактерными гастродуоденитами и другими заболеваниями выявлены антитела, имеющие собственную ферментативную активность, в том числе и БАПНА-амидазную [1, 2, 3]. Дальнейшее их изучение важно для понимания механизмов патогенеза различных заболеваний. Важно также изучение БАПНА-амидазной активности сывороток при различных заболеваниях.

Проблема оценки состояния ротовой полости остается актуальной из-за широкого распространения заболеваний пародонта [4.]. Состав слюны изменяется при ряде заболеваний и может использоваться для их диагностики. Это обусловило наш интерес к возможности оценки состояния ротовой полости при заболеваниях пародонта по трипсиноподобной активности слюны.

Таким образом, целью нашего исследования явилась разработка микрометода для определения БАПНА-амидазной активности и изучение активности IgG и сывороток у лиц страдающих от гнойно-воспалительных хирургических заболеваний, заболеваний соединительной ткани, а также активность различных штаммов микроорганизмов – возбудителей хирургической инфекции и слюны лиц, страдающих патологией ротовой полости.

Материалы и методы. Выделение иммуноглобулинов из сывороток больных проводилось риванол - сульфатным методом с использованием аффинной хроматографии на протеине А стафилококка. В результате получали иммуноглобулины G субклассов 1, 2, 4. Определение БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов, сывороток и слюны проводили по методу Эрлангера в нашей модификации [1, 5].

Для определения активности Ig в реакцию брали по 0,1 мл раствора БАПНА и антител в концентрации 1,5 мг/мл. Для сывороток брали 0,2 мл БАПНА и 0,005 мл сыворотки. При определении активности слюны в реакционную смесь брали 0,04 мл слюны и 0,2 мл БАПНА, а микроорганизмов – 0,1 мл раствора БАПНА и 0,1 мл взвеси микроорганизмов (10 млрд/мл). После 20-ти часовой инкубации определяли оптическую плотность проб при длине волны 410 нм. Пересчет единиц оптической плотности в пикокаталы проводили по формуле $Y=0,008+11 \times X$, где X - оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Результаты и обсуждение. Исследование БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов. Средний уровень БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов в группе больных хроническим остеомиелитом (группа I) был достоверно выше уровня БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов контрольной группы (III) (плановые хирургические больные, находящиеся в послеоперационном периоде, протекающем без гнойно-воспалительных осложнений). Уровень БАПНА-амидазной активности Ig среди лиц с различными острыми гнойно-септическими процессами (II) также был достоверно выше, чем среди хирургических больных без гнойно-воспалительных осложнений. Достоверных отличий в средних уровнях активности для групп больных с острыми и хроническими гнойными процессами обнаружено не было. Кроме того, в опытных группах встречались лица с уровнем БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов превышавшим средний уровень активности контрольной группы не менее чем на 3 средне-квадратичных отклонения – 17,6% обследованных в группе больных хроническим остеомиелитом и 12,8% обследованных в группе больных с острыми гнойными процессами (см. табл. 1).

Таблица 1

Результаты исследования БАПНА-амидазной активности Ig больных с хирургической патологией.

БАПНА-амидазная активность	I	II	III	Достоверность отличия
Ig	0,385±0,072 пкат (n=34)	0,416±0,082 пкат (n=47)	0,154±0,03 пкат (n=31)	$P_{1,3}<0,006$ $P_{1,2}>0,05$ $P_{2,3}<0,02$
Лица с повышенной активностью Ig	6 из 34 (17,6%)	6 из 47 (12,8%)	0 из 31 (0%)	$P_{1,3}<0,01$ $P_{1,2}>0,05$ $P_{2,3}<0,05$

БАПНА-амидазная активность сывороток у лиц с хирургической патологией.

Исследована 101 сыворотка. Средний уровень БАПНА-амидазной активности в I группе не отличался достоверно ($p>0,05$) от среднего уровня активности во второй и третьей группах.

Средний уровень активности сывороток хирургических больных с острыми гнойно-септическими процессами был достоверно ($p<0,01$) ниже, чем у больных без гнойных осложнений.

Средний уровень активности сывороток больных хроническим панкреатитом не отличался достоверно от уровня хирургических больных с другой патологией, за исключением группы больных с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями, $p<0,005$ (см. табл. 2).

Таблица 2.

БАПНА-амидазная активность сывороток у лиц с различной хирургической патологией.

I	II	III	Хр. Панк- реатит	Достоверность
$1,2 \pm 0,16$ пкат (n=24)	$0,74 \pm 0,2$ пкат (n=14)	$1,399 \pm 0,132$ пкат (n=37)	$1,64 \pm 0,195$ пкат (n=13)	$P_{I-III} < 0,01$ $P_{II-III \text{ хр.панк.реатит}} < 0,005$

Исследование БАПНА-амидазной активности микроорганизмов – возбудителей хирургической инфекции.

БАПНА-амидазная активность изучена у 168 изолятов микроорганизмов, выделенных от хирургических больных с гнойно-воспалительными процессами. Наиболее высокая средняя активность ($3,02 \pm 0,313$ пкат) определялась у штаммов *Proteus mirabilis*. При этом 21 штамм из 24 (87,5%) обладал активностью выше 1 пкат.

Все изученные 35 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* обладали активностью >1 пкат ($2,63 \pm 0,139$ пкат). Среди 7 изученных штаммов *Proteus vulgaris* активностью обладали все изоляты ($1,647 \pm 0,282$). Среди штаммов *Escherichia coli* активность выявлена у 29 штаммов из 30 ($1,107 \pm 0,146$ пкат), 50% из которых имели активность свыше 1 пкат. Все 5 исследованных изолята *Klebsiella pneumoniae* расщепляли БАПНА с различной активностью ($0,769 \pm 0,194$ пкат).

Из 11 штаммов *Acinetobacter baumannii* активность была обнаружена у 7 (73,64%; $0,353 \pm 0,097$ пкат), при этом изоляты с активностью выше 1 пкат не встречались.

Среди 11 исследованных штаммов *Enterobacter cloacea* активностью обладали только 4 (36,4%; $0,693 \pm 0,377$ пкат). Из исследованных 31 штаммов *Staphylococcus aureus* и 11 штаммов коагулазоотрицательных стафилококков (*S. epidermidis*, *S. capitis*) активностью не обладали все исследованные культуры.

Зависимость уровня БАПНА-амидазной активности IgG от вида микрофлоры у лиц с хирургической инфекцией.

При исследовании БАПНА-амидазной активности IgG было выявлено, что лиц, от которых были высеяны микроорганизмы с высоким уровнем активности, она оказалась достоверно выше, чем у лиц, от которых был высеян золотистый стафилококк, не обладающий активностью ($0,522 \pm 0,069$ ($n=4$) и $0,221 \pm 0,053$ ($n=4$), $p < 0,05$).

Исследование БАПНА-амидазной активности сывороток и иммуноглобулинов больных с системными коллагенозами.

Определение БАПНА-амидазной активности сывороток и иммуноглобулинов в этой группе проводилось методом Эрлангера в модификации Шатерникова [2].

Проведенная оценка сывороточной ферментативной активности обнаружила определенные отличия между обследованными группами. Результаты определения исходного уровня ферментативной активности сывороток представлены в таблице (см. таб. 3).

Таблица 3.

БАПНА-амидазная активность сывороток больных аутоиммунными заболеваниями.

Группы	Амидазная активность, ЕОП/мл
Больные системной красной волчанкой (n=9)	$1,31 \pm 0,23$
Больные ревматоидным артритом (n=15)	$0,92 \pm 0,06$
Больные аутоиммунным тиреоидитом (n=24)	$0,75 \pm 0,06$
Доноры (n=13)	$0,99 \pm 0,1$

Параллельно нами была изучена каталитическая активность препаратов IgG, выделенных из данных сывороток.

Результаты определения представлены в таблице 4.

Таблица 4.

БАПНА-амидазная активность препаратов IgG больных аутоиммунными заболеваниями

Группы	Амидазная активность, ЕОП/мг IgG
Больные системной красной волчанкой (n=9)	0,011±0,004
Больные ревматоидным артритом (n=15)	0,018±0,005
Больные аутоиммунным тиреоидитом (n=24)	0,028±0,007*
Доноры (n=11)	0,009±0,002

Примечание. звездочкой помечено достоверное более высокий уровень амидазной активности больных АИТ в сравнении с донорами ($p<0,05$) и больными СКВ. Другие различия между группами недостоверны.

Исследование бАПНА-амидазной активности слюны.

Для определения показателей нормы трипсиноподобной активности слюны нами обследовано 38 человек без патологии ротовой полости. Активность слюны в контрольной группе составила $2,73 \pm 0,51$ пкт.

Исследуемую группу составили 11 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. Всем больным в течение 10 дней проводилась комплексная терапия. В результате лечения у всех больных отмечалась положительная динамика. На фоне клинических изменений у 10 из 11 обследуемых больных наблюдалось значительное достоверное уменьшение БАПНА-амидазной активности с $3,563 \pm 0,436$ до $1,393 \pm 0,371$ пкат ($p<0,001$).

Выводы:

1. Разработан микрометод для определения трипсиноподобной активности сывороток, иммуноглобулинов, микроорганизмов и слюны.

2. Выявлен ряд закономерностей трипсиноподобной активности Ig. Так установлено:

1) БАПНА-амидазная активность иммуноглобулинов возрастает у лиц с хирургической инфекцией в сравнении с хирургическими больными без гнойных процессов.

2) БАПНА-амидазная активность иммуноглобулинов у лиц с аутоиммунным тиреоидитом достоверно выше, чем у больных СКВ и здоровых доноров.

3. Выявлена зависимость уровня БАПНА-амидазной активности Ig от вида микроорганизма, вызвавшего патологический процесс.

4. Показано, что уровень БАПНА-амидазной активности слюны может являться критерием эффективности терапии заболеваний ротовой полости.

Литература:

1. В.К. Окулич, А.Н. Косинец, С.А. Сенькович, Е.А. Конопелько «Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов класса G» // инструкция на метод, регистрационный №6-0101 – 2002г

2. Москалев К.В., Конорев М.Р., Азаренок К.С. Гидролиз бензоиларгинин-р-нитроанилида поликлональными антителами // Реферативный журнал. Иммунология. Аллергология. -1990. - N12. - С. 44

3. Щуров Д. В. Каталитические антитела (обзор). // Молекулярная биология. – 1997 - №1 – С. 5-15

4. Current Procedural Terminology for Periodontics. Chicago: American Academy of Periodontology, 1989

5. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. //Arch Biochem. Biophys. – 1961 – Vol 95. – P. 271-276

6. Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A. DNA hydrolyzing autoantibodies // Science. - 1992. - Vol 256, №5057. - P. 665-667